

PCT/JP00/04837

19.07.00

WIPO	PCT
REC'D 12 SEP 2000	

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 7月21日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第206316号

出願人

Applicant(s):

小関 良宏

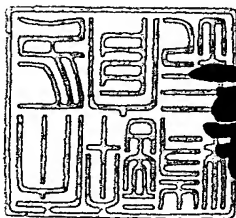
三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

# PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office



及川耕造

出証番号 出証特2000-3066540

書類名】	特許願
【整理番号】	469JP
【提出日】	平成11年 7月21日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12N 15/09 A01H 5/00 C12N 5/14
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都府中市緑町2-6-1-1007
【氏名】	小柳 美喜子
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都東久留米市大門町2-3-6-302
【氏名】	小関 良宏
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府豊中市三和町1丁目1番11号 三栄源エフ・エ
	フ・アイ株式会社内
【氏名】	香田 隆俊
【特許出願人】	
【住所又は居所】	東京都東久留米市大門町2-3-6-302
【氏名又は名称】	小関 良宏
【特許出願人】	
【識別番号】	000175283
【氏名又は名称】	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100065215
【弁理士】	
【氏名又は名称】	三枝 英二
【電話番号】	06-6203-0941

【選任した代理人】

【識別番号】 100076510

【弁理士】

【氏名又は名称】 掛樋 悠路

【選任した代理人】

【識別番号】 100086427

【弁理士】

【氏名又は名称】 小原 健志

【選任した代理人】

【識別番号】 100090066

【弁理士】

【氏名又は名称】 中川 博司

【選任した代理人】

【識別番号】 100094101

【弁理士】

【氏名又は名称】 館 泰光

【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 健治

【選任した代理人】

【識別番号】 100105821

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

【選任した代理人】  
【識別番号】 100108084  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 中野 睦子  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 001616  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 9708179  
【フロップの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規 M I T E 様因子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標的配列：

(A) n G (A) n [n は 1 以上の整数]

の重複を引き起こす M I T E 様因子。

【請求項 2】 5' 末端及び 3' 末端に末端逆反復配列を有する請求項 1 記載

の M I T E 様因子。

【請求項 3】 式：

X t t g c a a Y (1)

(式中、X は g 又は t を、Y は a 又は c を示す)、または

式：

Z a t g c a a (2)

(式中、Z は t 又は a を示す)

で示される塩基配列の少なくとも 1 つを、複数反復して含有する請求項 1 または

2 記載の M I T E 様因子。

【請求項 4】 末端逆反復配列として、5' 末端に配列番号 1 の塩基配列、3

末端に配列番号 2 の塩基配列を有する、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の M

I T E 様因子。

【請求項 5】 配列番号 3 の塩基配列からなる M I T E 様因子。

【請求項 6】 末端逆反復配列として、5' 末端に配列番号 4 の塩基配列、3

末端に配列番号 5 の塩基配列を有する M I T E 様因子であって、標的配列 T A

の重複を引き起こす M I T E 様因子。

【請求項 7】 配列番号 6 の塩基配列からなる M I T E 様因子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は植物に由来する新規な可動性因子 (miniature-inverted repeat tran

sposable element: M I T E)、より詳細にはニンジン (Daucus carota) より

単離された新規な可動性因子に関する。

【0002】

【従来の技術】

可動性因子は、原核生物及び真核生物の別や動物及び植物の別を問わず、ほとんどの生物種のゲノムに見い出されている。これらの可動性因子は、ゲノムを動き回ることによって転移した導入配列前後の遺伝子を不活性化または活性化すること知られている。さらに最近、可動性因子はかかる作用のみならず、多様なゲノム再編成（欠失、反転、重複など）を引き起こすことがわかり、これによって生物の進化にとって重要なゲノム可塑性（genome plasticity）が生じること、特に、可動性因子は、ストレス（genomic stress）に対して対抗できる環境適応に向けて生物を進化させる重要な役割を果たしていることが報告されている（McClintock, Science 26:792-801(1984)；Arber ら, FEMS Microb. Ecol., 15: 5-

14 (1994)）。

【0003】

可動性因子は、大きくDNA型（トランスポゾンおよび挿入配列）、RNA型（レトロトランスポゾン）（Bergら編集, Mobile DNA (1989)）、並びにこれらのいずれにも属さない miniature-inverted repeat transposable element (MITE) (Wesslerら, Curr. Opin. Genet. Dev. 5 : 914-821 (1995)) の3種類に大別されている。

【0004】

そのうちDNA型およびRNA型の可動性因子については、それらが実際にゲノム内で転移している実体が検出されているが、MITEについては、DNA型に非常によく似ているにもかかわらず、現在までその転移を実証的に観察したという報告はない。

【0005】

MITEは、現在進められているゲノム・プロジェクトによって解明されつつある各種生物のゲノム遺伝子の塩基配列のデータ・ベースから、コンピュータ検索によって見出されたものが殆どであり、1992年に初めてBureauらによってTourist属が見い出されて以来(Bureau ら, Plant Cell 4: 1283-1294 (1992))

、植物ゲノム並びに昆虫や動物のゲノムからも各種のMITEが見い出されている。

【0006】

一般にMITEは、(1) その5'末端及び3'末端の両端に完全もしくは不完全な逆反復配列を有する(この点でDNA型可動性因子と類似する。)、(2) その逆反復配列の両末端側に、DNA型可動性因子がゲノムDNAに挿入される際に生じるのと同様に、2塩基対以上の同方向反復配列を有する標的重複配列様の配列が見い出される、及び(3) 大きさが一般的に2 kb以下である、といった特徴を有するものとして定義されている(Wesslerら, Curr. Opin. Genet. Dev. 5 : 914-821 (1995))。

【0007】

ところでMITEについて、DNA型可動性因子のように、両端の逆反復配列の間にトランスポザゼをコードするオープンリーディングフレームを有するものは、カビや動物から見い出されたIS630-Tc1/Mariner属のMITEだけであり(Kachrooら, Mol. Gen. Genet. 245 : 339-348 (1994); Smitら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 1443-1448 (1996))、植物に由来するMITEにはかかるトランスポザゼをコードするオープンリーディングフレームは見えない。

【0008】

このため、植物におけるMITEに関して、それがどのような機構で転移するのか、またその働きについて、未だ解明されていない部分が多い。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

MITEの働きに関しては、これまでの研究からMITEが様々な遺伝子のプロモーター上流域に多く見い出されていることから(Wesslerら, Curr. Opin. Genet. Dev. 5 : 914-821 (1995))、遺伝子プロモーターの活性化に寄与している可能性も考えられる。また、MITEは matrix attachment region (MAR)の近傍にも数多く見い出されていることから(Avramovaら, Nucleic Acids Res. 26 : 761-767 (1998))、ゲノムの構造に重要な関わりを持っていることも考えられる。

【0010】

このように、MITEは、未だ研究の進んでいないゲノム構造と遺伝子発現の関係を明らかにするという点において学術上極めて興味ある可動性因子（挿入因子）であるとともに、MITEがゲノム遺伝子間を転移し組み込まれることによってゲノム構造を変え、その結果として遺伝子の発現活性をコントロールしている可能性から、外来遺伝子導入の際の遺伝子発現活性の安定化、又は不活性化を抑制する因子としての有用性が期待されている。

【0011】

そこで本発明は、上記のように学術上並びに産業上有用な、植物に由来する新規なMITE様因子を提供することを目的とするものである。より詳細には、本発明は、ニンジン（*Daucus carota*）に由来する新規MITE様因子を提供することを目的とするものである。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、ニンジン核内に存在する複数のフェニルアラニンモニリアーゼ（PAL: phenylalanine ammonia-lyase）遺伝子プロモーターの全塩基配列を決定していたところ、偶然にもMITE様の因子の存在を見出し、その単離に成功し、さらにその構造が従来公知のMITEのいずれにも属さない新規なMITE様因子に属するものであることを見出した。本発明はかかる知見に基づくものである。

【0013】

すなわち本発明の第一は、下記項1〜5に掲げる新規MITE様因子である（以下、かかるMITE様因子を便宜上「IS2因子」とも称する。）：

項1. 標的配列：(A) n G (A) n [nは1以上の整数]

の重複を引き起こすMITE様因子。

項2. 5'末端及び3'末端に末端逆反復配列を有する項1記載のMITE様因子。

項3. 式(1)：X t t g c a a Y（式中、Xはg又はtを、Yはa又はcを示す）、または、



式(2):  $Zatgca$  (式中、Zはt又はaを示す)

で示される塩基配列の少なくとも1つを、複数反復して含有する項1または2記載のMITF様因子。

項4. 末端逆反復配列として、5'末端に配列番号1の塩基配列、3'末端に配列番号2の塩基配列を有する、項1乃至3のいずれかに記載のMITF様因子。

項5. 配列番号3の塩基配列からなるMITF様因子。

【0014】

さらに本発明の第二は、下記項6及び7に掲げる新規MITF様因子である(以下、かかるMITF様因子を便宜上「ISI因子」とも称する。):

項6. 末端逆反復配列として、5'末端に配列番号4の塩基配列、3'末端に配列番号5の塩基配列を有するMITF様因子であって、標的配列TAの重複を引き起こすMITF様因子。

項7. 配列番号6の塩基配列からなるMITF様因子。

【0015】

公知のMITFとしては、前述するように今までTourist、Stowawayの他、Castaway、Crackle、Emigrant、Ditto、Gaijin、Krispie、Pop、Snap、Wanderer、Wujin、Wukong、Wuneng、Xbrが見い出されている。これらMITF因子の構造的特徴はすべて末端に完全に不完全な逆反復配列を有している点であるが、各々のMITF因子においてその逆反復配列の塩基配列および長さは全く異なっている。さらに、これらのMITF因子の挿入重複配列はTouristがTAA、StowawayがTAA、CrackleがGTTGATAT、DittoがTTA、EmigrantがTA、GaijinがATTもしくはTAGもしくはTGAMもしくはGGTもしくはGTA、KrispieがTTGAAC、PopがAACAACAもしくはAATAA、SnapがTTTTT、WandererがTTAもしくはTAA、WujinがTAもしくはCATTA、WukongがTTAもしくはTACA、WunengがTTAもしくはTTAT、XbrがTTAである。(なおExplorerには明確な挿入重複配列は見い出されていない)(Bureauら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 8524-8529 (1996)、Casacubertaら、Plant J., 16: 79-85 (1998)、Songら、Mol. Gen. Genet., 258: 449-456 (1998)、T

u, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:7475-7480 (1997)、Unsal と Morgan, J. Mol. Biol., 248: 812-823 (1995)。

【0016】

一方、上記本発明のIS2因子は、挿入重複配列として、上記従来のMITF(挿入因子)ではみられない(A)nG(A)n[nは1以上の整数]を有するものであり、その点で従来公知のフミリーのいずれにも属さない新規なフミリーに属する挿入因子であるといえる。

【0017】

また、本発明のIS1因子は挿入重複配列としてTAを有しており、これから従来公知のフミリー-Stowaway属(Bureau and Wessler (1994))に属する、新規なMITF様因子であるといえる。

【0018】

【発明の実施の形態】

(1) IS2因子

本発明の第一のMITF様因子(IS2因子)は、ゲノム遺伝子の挿入部位に(A)nG(A)nの重複をもたらすことを特徴とするものである。ここでnは1以上の整数であればよく、特に制限されないが、具体的には2～6、好ましくは3～5、より好ましくは4を挙げることができる。

【0019】

本発明のMITF様因子は、より具体的には、大きさが2kb程度以下、好ましくは0.2～2kb程度のDNAであり、その5'末端及び3'末端に互いに逆向きの反復配列(末端逆反復配列)を有するものである。

【0020】

かかる点から、本発明のIS2因子は前述する(1)～(3)の要件、すなわち(1)5'末端及び3'末端の両端に完全若しくは不完全な逆反復配列を有すること、(2)遺伝子挿入部分の逆反復配列の両側に重複配列として2塩基対以上の同方向反復配列が見出されること、(3)大きさが2kb以下であることといった、3つの要件を満たすことから、MITF様配列を有する可動性因子(挿入因子、MITF様因子)であると規定することができる。

【0021】

本発明のIS2因子は、他の構造的な特徴として、その塩基配列中に

式(1) :  $Xtltgcay$  (式中、Xはg又はtを、Yはa又はcを示す) (配列番号7~10)、または

式(2) :  $Zatgc aa$  (式中、Zはt又はaを示す) (配列番号11~12)

で示される塩基配列の少なくとも1つを、連続又は非連続に反復して含有するものである。

【0022】

かかる反復配列の位置及びその数は特に制限はなく、IS2因子の両末端域に

位置する末端逆反復配列中、または該末端逆反復配列間に挟まれた中間領域中に含まれていても良い。

【0023】

本発明のIS2因子として具体的には、図1に示すように、上記式(1)及び

式(2)で示される反復配列を複数、末端逆反復配列間の中央領域中に含み、また式(1)で示される反復配列を複数、末端逆反復配列中に含む構造を有するもの

を挙げることができる。

【0024】

本発明のIS2因子が有する末端逆反復配列は、両者が互いに厳格に相補的な

配列である必要はなく、5'末端領域と3'末端領域とがストリメンツェントな条件下で互いにハイブリダイズし、その結果、IS2因子が図1に示すようにシステム

構造となるものであれば足りる。この意味で本発明のIS2因子は、末端逆反復配列として完全のみならず不完全な逆反復配列を有するものを包含するものであ

る。

【0025】

本発明の具体的なIS2因子としては、末端逆反復配列として、5'末端領域

に配列番号1の塩基配列を有し、また3'末端領域に配列番号2の塩基配列を有するものを例示することができる。IS2因子としてより具体的には、配列番号

3の塩基配列を有するものを挙げることができる。なお、IS2因子は、それ自身の機能または活性を実質的に有する機能の同等物であるかぎり、末端逆反復配

列もしくはこれらの反復配列に挟まれた中央領域に位置する配列において、1つまたは複数のヌクレオチドが置換、付加または欠失していてもよく、本発明のMITF様因子はかかる機能的同等物を包含するものである。

【0026】

好ましい機能的同等物としては、配列番号3の塩基配列を有するIS2因子の機能または活性を実質的に有し、挿入部位において(A)nG(A)n[nは1以上の整数]の重複を引き起こし、かつ上記IS2因子とストリンジエントな条件下でハイブリダイズするものを挙げることができる。尚、ストリンジエントな条件としては、1×SSC、0.1%w/w SDS中、50℃以上で1時間の条件を挙げることができる。より具体的には、機能的同等物として、上記機能を有するとともに、配列番号3で示されるIS2因子と比べた場合に、塩基配列において70%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上のホモロジーを有するものを挙げることができる。

(2) IS1因子

本発明のMITF様因子(IS1因子)は、 $\Delta$ 遺伝子の挿入部位にTAの重複をもたらすものであり、末端領域に反復配列として5'末端領域に配列番号4の塩基配列を、また3'末端領域に配列番号5の塩基配列を有することを特徴とする。また本発明のIS1因子は、具体的には大きさが1kb程度以下、好ましくは100bp～500bp程度のDNAを挙げることができる。このような点から、本発明のIS1因子も、上記IS2因子と同様に、MITF様の因子であると規定することができる。

【0027】

本発明のIS1因子として具体的には、図2に示す構造を有するものを例示することができる。より具体的には配列番号6の塩基配列を有するものを例示することができる。なお、かかる塩基配列を有するMITF様因子は、それ自身の機能または活性を実質的に有する機能的同等物であるかぎり、末端逆反復配列もしくはこれらの反復配列に挟まれた中央領域に位置する配列において、1つまたは複数のヌクレオチドが置換、付加または欠失していてもよく、本発明のMITF様因子はかかる機能的同等物を包含するものである。

【0028】

好ましい機能的同等物としては、配列番号6の塩基配列を有するMI TE様因子 (IS1因子) の機能または活性を實質的に有し、かつ該IS1因子と比べた場合に、それぞれ塩基配列において85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上のホモロジーを有するものを挙げることができる。

【0029】

以上で説明する本発明のMI TE様因子 (IS2因子、IS1因子) は、いずれも後述するようにニンジンのゲノム、具体的にはニンジンのフェニルアラニン・アミノリアーゼ遺伝子から見出されたものであり、本明細書の記載に従って、これらのものから単離・取得することができる。しかしながら、本発明のMI TE様因子は、前述する構造ならびに特性を有するものであるかぎり、その由来を何ら制限するものではない。

【0030】

【発明の効果】

可動性因子は植物ゲノム自身の自己改変のセルフメカニズムとして生物の進化や環境適応に大きく関与している可能性が指摘されている。

【0031】

本発明のMI TE様因子に関して、それが植物ゲノムの自己改変のセルフメカニズムに対してどういったメカニズムによって機能するかについては不明であるが、レトロトランスポソンの場合 (McDonald, BioScience 40 : 183-191 (1990)) のように、内部にエンハンサー・エレメントを有していて、その因子が転移することによってそのエンハンサー・エレメントが挿入された遺伝子プロモーターの活性化を示すということは見られない。

【0032】

従って、本発明のMI TE様因子は、植物ゲノム中に挿入されることによって、ゲノム構造の変化を引き起こし、それがもとで従来のエンハンサー・エレメントとは全く異なったメカニズムによって、ゲノムDNAの巻き戻しのしやすさ、ヌクレオソーム構造の変化といったゲノム構造のダイナミクスの変化に寄与している可能性が高いものと考えられる。

【0033】

本発明のMITE様因子によれば、この性質を利用して、これまでとは異なった手法によって、その近傍に存在する遺伝子の発現を制御することが可能となる。一般に、外来遺伝子が、ゲノムDNAのcryptic siteに挿入されると、その発現が抑制ないしは不活性化することが指摘されている。ゆえに本発明のMITE様因子によれば、上記性質に基づいて、遺伝子組み換えによって導入された外来遺伝子の低下した発現能を賦活化ないしは活性化することが可能と考えられる。このことから、本発明のMITE様因子は遺伝子組み換え生物の作出において、導入遺伝子発現用カセット及び該カセットを含むプラスミドの構築に有用であり、更にこれらを用いることによって、導入遺伝子を発現する遺伝子組み換え生物の安定した作出に有用である。

【0034】

【実施例】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。ただし、本発明はかかる実施例によって何ら限定されるものではない。なお、本発明で用いられる遺伝子工学的技術並びに分子生物学的実験操作（制限酵素処理条件、ライゲーション反応条件、大腸菌へのトランスフォーマーメーション方法等）は、一般に広く用いられている方法、例えばJ., Sambrook, E., F., Fritsch, T., Maniatis著、モレキュラークローニング第2版 (Molecular Cloning 2nd edition)、コールド・スプリング・ハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory press) 発行、1989年及びD., M., Glover著、DNAクローニング、IRL発行、1985年などに記載されている方法に従って行うことができる。

実施例1

1) 標的植物、標的遺伝子

MITE様因子の探索にあたり、標的植物としてニンジンを用いた。具体的に、ニンジン (*Daucus carota* L. cv. Kurodagosun) のフェニルアラニンモニトリアーゼ (PAL) 遺伝子を用いた。  
2) ニンジンPAL遺伝子 gDCPAL3および gDCPAL4のクローニング  
ニンジン核DNAライブラリーから、ニンジン核遺伝子をクローニングした。

なお、ニンジンの核DNAライブラリーは、本発明者の先行文献 (Ozeki et al. (1993)) の記載に従って、ニジン培養細胞 (Ozeki and Komamine (1981)) から  $\lambda$  EMBL3 ベクターを用いて作成した。

### 【0035】

具体的には、ニンジンの核DNAを、Murray and Thompson(1980)の方法に従って、臭化セチルトリメチルアモニウム (CTAB) 溶液を用いて凍結乾燥したニンジンから調製した。得られた核DNAを Sau3AI で部分消化し、シヨ糖濃度勾配法によってサイズ分画した。15~20kbpの範囲にあるDNA画分を集めて、BamHI消化した  $\lambda$  EMBL3にライゲーションして、フーズ粒子内にパッケージングすることによってニジン核ライブラリーを構築した。

### 【0036】

次いで、ニジンPAL (フェニルアラニンアミノリアーゼ) ガラムクロームを、Ozeki et al. (1990) においてクロームニングされた PAL cDNA (ANT-PAL cDNA) をプロローグとして用いてスクリーニングした (Sambrook et al. 1989)。なお、ニジン核ライブラリーのスクリーニングのハイブリダイゼーションは、 $6\times$ SSC, 60mM リン酸ナトリウム (pH6.8), 10mM EDTA, 1% SDS, 0.02% ボリビニルピロリドン, 0.02% Ficoll 400, 及び  $100\mu\text{g/ml}$  変性サケ精子DNAを含む溶液で68℃で終夜処理することにより行った。また、ヌンジンの洗浄は、 $2\times$ SSC, 0.5% SDSの溶液中で室温15分で2回、 $0.1\times$ SSC, 0.1% SDSの溶液中で室温10分で2回、最後に  $0.1\times$ SSC溶液中68℃で30分を2回行うことによつて実施した。

### 【0037】

その結果、8個のポジティブ・クロームが得られた。かかるクロームについて制限酵素マッピングを作成したところ、それらは2種類に分類され、それらをおの

の gDCPAL3および gDCPAL4と命名した。

### 【0038】

gDCPAL3 について、Sambrook et al. (1989)に記載された方法でポジティブ・クロームのライブラリーを培養し、 $\lambda$  DNAを抽出して Bam HI で切断し、ナイロ

ン膜にサザン・トランスファーを行った。これをプローブとしてANT-PAL cDNAを

EcoRIで切断した時に得られるDNA断片(984 bp)の5'端を<sup>32</sup>Pで標識したものをを用いてサザン解析を行い、プローブがハイブリダイズする2.77 kbpのDNA断片を得た。このDNA断片を、Bam HIで切断し calf intestine alkaline phosphatase (CIP)処理した pBluescript SKプラスミドにサブ・クローニングしてgDCPAL3-pro/SKを得た(図3参照)。次いで得られたプラスミドgDCPAL3-pro/SKを、制限酵素Sal IとApa Iで切断し、Sambrook et al. (1989)に記載された方法で Exonuclease IIIおよび Mungbean nucleaseを用いて、一連の欠失DNA断片群を作成し、これらを用いて DNAの塩基配列を決定した。Ozeki and Takeda (1994)に示したニンジンから抽出した mRNAを用いたプライマー・エクステンション法によって見い出されたバンドの位置から転写開始点(+1)を決定した。

### 【0039】

gDCPAL4についても同様にして、上記に対応するプラスミドgDCPAL4-pro/SKを作成して、転写開始点を決定した。具体的には、ポジティブ・クローンgDCPAL4のランニングから得たλ DNAを Hind IIIと Bam HIで切断し、同上のプローブを用いてサザン解析を行い、プローブがハイブリダイズする1.63 kbpのDNA断片を Hind IIIと Bam HIで切断し CIP処理した pBluescript SKプラスミドにサブ・クローニングしてgDCPAL4-pro/SKを得た。次いで得られたプラスミドgDCPAL4-pro/SKを、制限酵素Xba Iと BstX Iで切断し、Sambrook et al. (1989)に記載された方法で Exonuclease IIIおよび Mungbean nucleaseを用いて、一連の欠失DNA断片群を作成し、これらを用いて DNAの塩基配列を決定した。

### 3) 結果

決定した gDCPAL3および gDCPAL4の塩基配列を比較したところ、gDCPAL3プロモーター領域には gDCPAL4には見られない不完全な逆向き繰り返し配列を持った miniature inverted-repeat transposable element (MITE) が、-1897～-1599 (長さ299 bp)および-1157～-389 (長さ769 bp)の2箇所に存在すること

### 【0040】



これらの配列並びに挿入部位周辺の塩基配列について、それぞれオートシーケンサー (ABI社製) でシーケンスを行った。IS1の塩基配列を配列番号6に、IS2の塩基配列を配列番号3にそれぞれ示す。

## 【0041】

これらのIS1及びIS2の性状は下記の通りであった。

## ① IS1

配列番号6に示す塩基配列 (全長299bp) からなり、5'末端及び3'末端にはそれぞれ互いに不完全な逆反復配列 (32bp) を有し、また標的遺伝子であるゲノムへの挿入部位にはTAの標的逆反復配列が見られた。このことからすでに報告されている Stowaway 属 (Bureau and Wessler (1994)) に属する新規なMITB因子の遺伝子配列であることが推定された。IS1因子のシステム構造、並びに末端逆反復配列領域及び挿入部位領域の構造を図2に示す。

## 【0042】

また得られた塩基配列の情報をもとに、市販のデータベース (例えばGENE TYX-MAC/CD1995) を用いて塩基配列のホモロジー解析を行ったところ、すでに報告

されている Stowaway 属 (Bureau and Wessler (1994)) に属するMITB様因子の遺伝子配列と末端逆反復配列において70~90%の割合でホモロジーがあり、このことから当該因子がStowaway属に属する挿入因子であることが確認された (図

5)。

## ② IS2

配列番号3の塩基配列 (全長769bp) からなり、5'末端及び3'末端に不完全な逆反復配列 (158bp) を有し、また標的遺伝子であるゲノムへの挿入部位にAAAAAGAAAの標的逆反復配列が見られた。塩基配列のホモロジー比較を行ったが、既知挿入因子との相同性が見られず、このことから従来の挿入因子ファミリーに属さない新規なファミリーを構成する挿入因子、特にMITB様因子であることが判明した。このシステム構造、並びに末端逆反復配列領域及び挿入部位領域の構造を図1及び図6に示す。

## 【0043】

なお、本発明で引用する文献は下記の通りである。

1. Bureau, T. E. and Wessler, S. R. Stowaway : a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell*, 6 : 907-16 (1994)
2. Mita, S., Suzuki-Fujii, K. and Nakamura, K. Sugar-inducible expression of a gene for  $\beta$ -amylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 107 : 895-904 (1995).
3. Ozeki, Y., Matsui, K., Sakuta, M., Matsuka, M., Ohashi, Y., Kano-Murakami, Y., Yamamoto, N. and Tanaka, Y. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during anthocyanin synthesis and by transfer effect in carrot cell suspension cultures. *Physiol. Plantarum*, 80 : 379-387 (1990).
4. Ozeki, Y., Davies, E. and Takeda, J. Structure and expression of chalcone synthase gene in carrot suspension cultured cells regulated by 2, 4-D. *Plant Cell Physiol.*, 34 : 1029-1037 (1993).
5. Ozeki, Y. and Komamine, A. Induction of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture : Correlation of metabolic differentiation with morphological differentiation. *Physiol. Plantarum*, 53 : 570-577 (1981).
6. Ozeki, Y. and Takeda, J. Regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes in carrot suspension cultured cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38 : 221-225 (1994).
7. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning*, a Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).
8. Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8 : 4321-4325.

【0044】

【配列表】

<110> Ozeki, Yshihiro; Saneigen fti Inc.

<120> Novel MITE-like element

<130> 469JP

<160> 12

<210> 1

<211> 158

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 1

ggatctttt taataatacc catctgtaaa attattttt taataatatt accatcttt  
120 tcatgtttt taataatacc ttccataaa tttttttt caaataacg attgcaact  
158 ttgcaacct cattgcaac ctggcgcg gcagccgt

<210> 2

<211> 158

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 2

acgctggcg ccgccctgtag ttgcaaatga gttgcataaa gttgcataca gtattttga  
60 aaaaaagatt ttatgaaaag gtattttta aaataatct ggaagtagt attttgaaa  
120 acaataaag aaaagtagg tagttttaga gattccc  
158

<210> 3

<211> 769

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 3

ggatcctttt taaaatacc catcgttaa atattttt taaaatact accatctttt  
120 tcatgtttt taaaatacc tttcataa tttttttt caaaaatacg atttgcaact  
180 ttgcaacct catttgcaac ctgggcggc gcagccgta aagttgccag tgaagttgca  
240 aagttgca atgatttgt aagattgca aatgagttg caaagttgc aaataaaaat  
300 ggaagttgc aacagttgca actgcaatg caactagttc aactgaaaac tgaagttgc  
360 aaaaattgca aatgagttg caactaaatg caactgaaa ctgtaagtaa caacagattgt  
420 atgtgtgtcc cctggcgggc cgttagatt acaatagaa caactgaatg caatcatatg  
480 caactgaata caatcatatg caatcatata tgcatttaca aatcctgatt tcaagttcca  
540 gtttcgcaat gtcatittcg aatcgtatat atatatatat cgatttcgaa  
600 aatgcaatc gaaaactgga acttgaatc aggaattcag ctgcataatg agttgcaaaa  
660 gaggttgca cagcctggc gccgcctgta gtgcaaatg agttgcaaa agttgcaaac  
720 agtatittg aaaaaaatgt ttatgaaa gttattttt aaaaataatc tggaggtag  
769 tattttgaa aacaataaaa gaaaaggtag gtattttgt agatttccc

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 4

ctccctacgt cccattttat gtgaacctat tt

32

<212> DNA

<211> 32

<210> 5

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)  
<212> DNA  
<211> 8  
<210> 8  
<400> 8  
gttgcaaa  
<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)  
<212> DNA  
<211> 8  
<210> 7  
acattttct taatctcgt gaaagtcaca ctaattcaca taaaatggga cagagggag  
299  
aaatcataa ttaaatatg ataggtccac cactttacc actttcaca tacatttact  
240  
ttatactat ttatatata aataaacact attacacca ctactttct ccaatactc  
180  
cctagaatac ttactatitt ttaacaactat ttltcaactat tacacccacc aactctatat  
120  
ctccctacgt cccattttat gtgacctcat ttctttttg ggaagtcaca aaaaaataa  
60  
<400> 6  
<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)  
<212> DNA  
<211> 299  
<210> 6  
aaatcataa acataaatg ggaagggag ag  
32  
<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

gttgcaac 8

<210> 9

<211> 8

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 9

tttgcaaa

8

<210> 10

<211> 8

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 10

tttgcaac

8

<210> 11

<211> 7

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 11

tatgcaa

7

<210> 12

<211> 7

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 12

aatgcaa

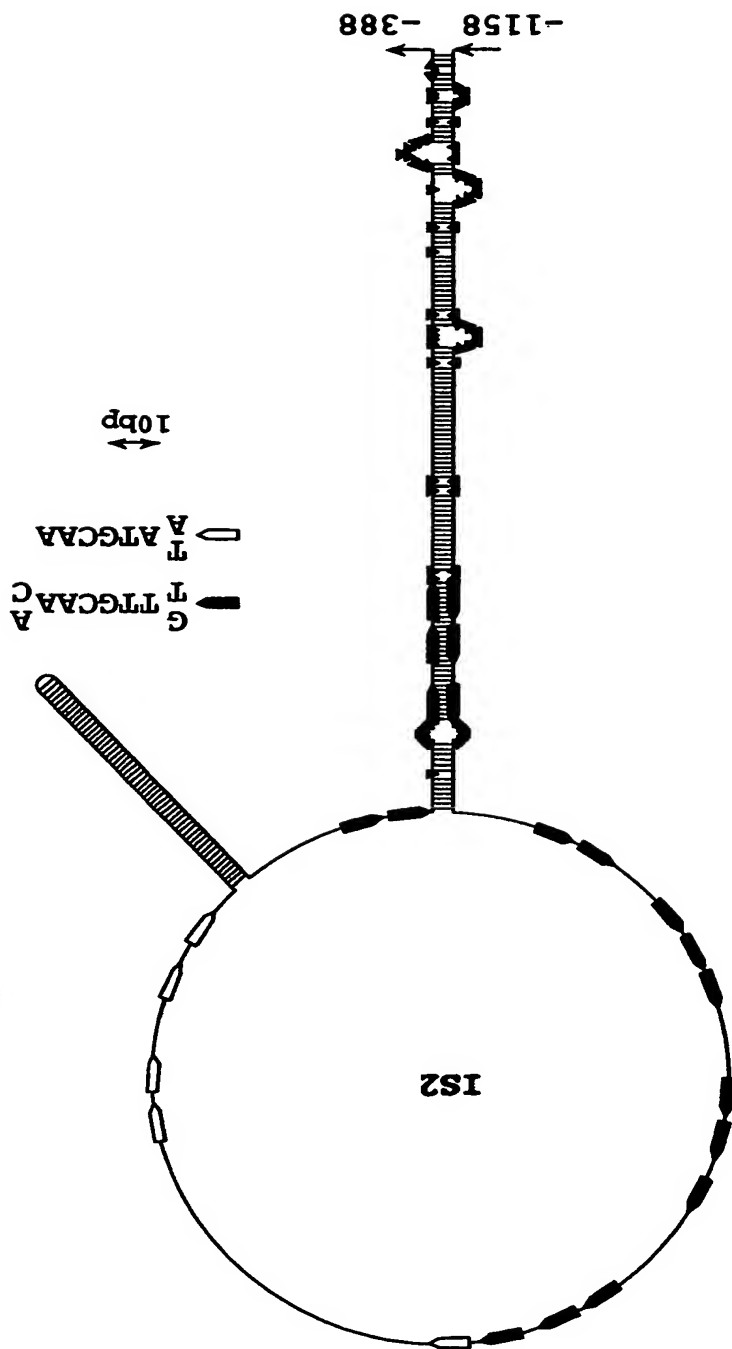
7



【図面の簡単な説明】

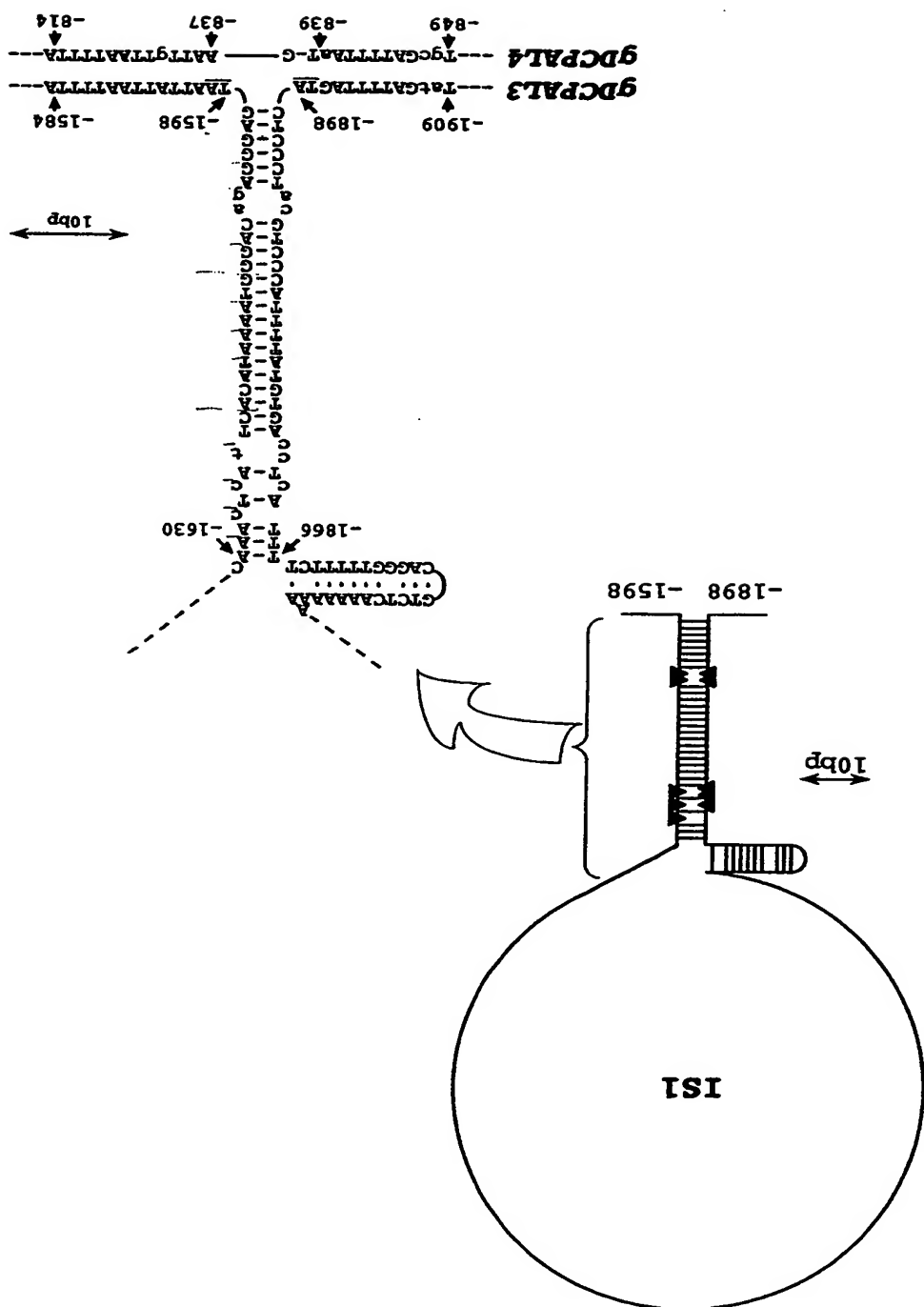
- 【図1】本発明のM I T E様因子、I S 2 因子の構造を示す。
- 【図2】本発明のM I T E様因子、I S 1 因子の構造、及びその末端逆反復配列、挿入重複配列（下線部分のT A）を示す。
- 【図3】gDCPAL3-pro/SKの構築方法を示す概略図である。
- 【図4】ニンジン PAL遺伝子 gDCPAL3および gDCPAL4との構造を比較した図である。
- 【図5】本発明のM I T E様因子（I S 1 因子）の塩基配列を、従来公知の Stowaway属の塩基配列（Bureauおよび Wessler, Plant Cell, 6 : 907-917 (1994)）と比較した結果を示す図である。黒字に白抜きの配列が相同性が見られる末端逆反復配列である。
- 【図6】本発明のM I T E様因子、I S 2 因子の末端に見られる不完全逆反復配列、挿入重複配列（下線矢印部分のA A A A G A A A）を示す。

IS2 因子の構造



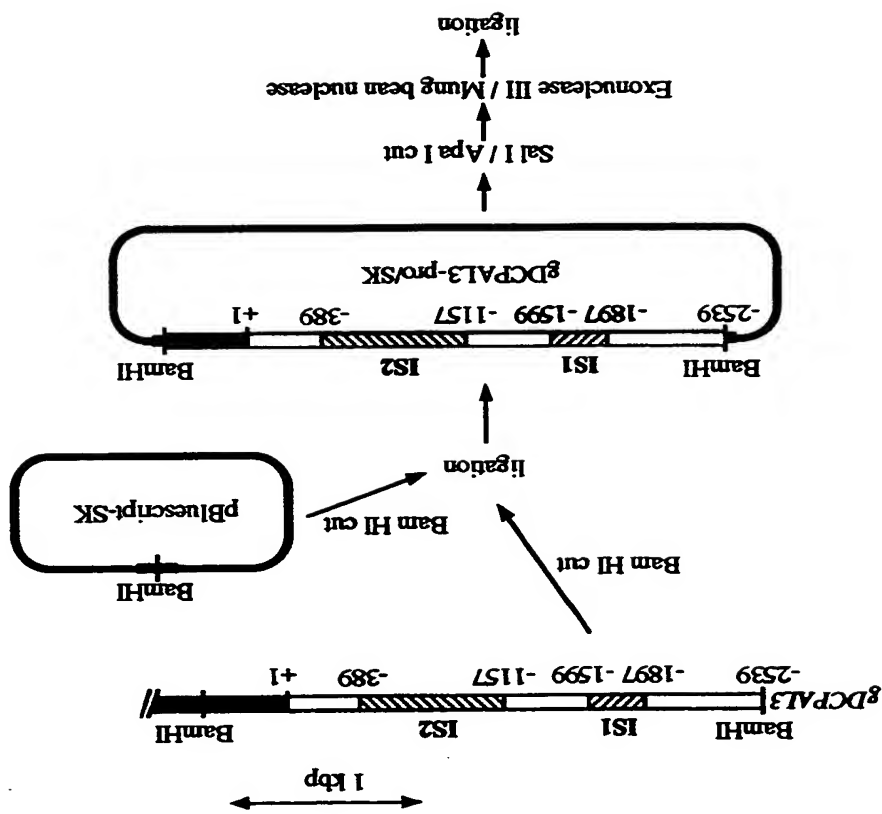


## ISI 因子の構造

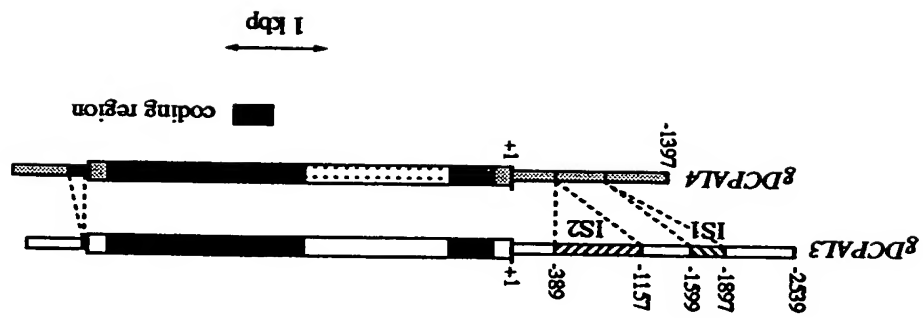


【図 3】

ニジジ *gDCPAL3* 遺伝子からの IS1 因子および  
IS2 因子のクローニング




ニンジン PAL 遺伝子 gDCPAL3 および gDCPAL4 の  
構造の比較

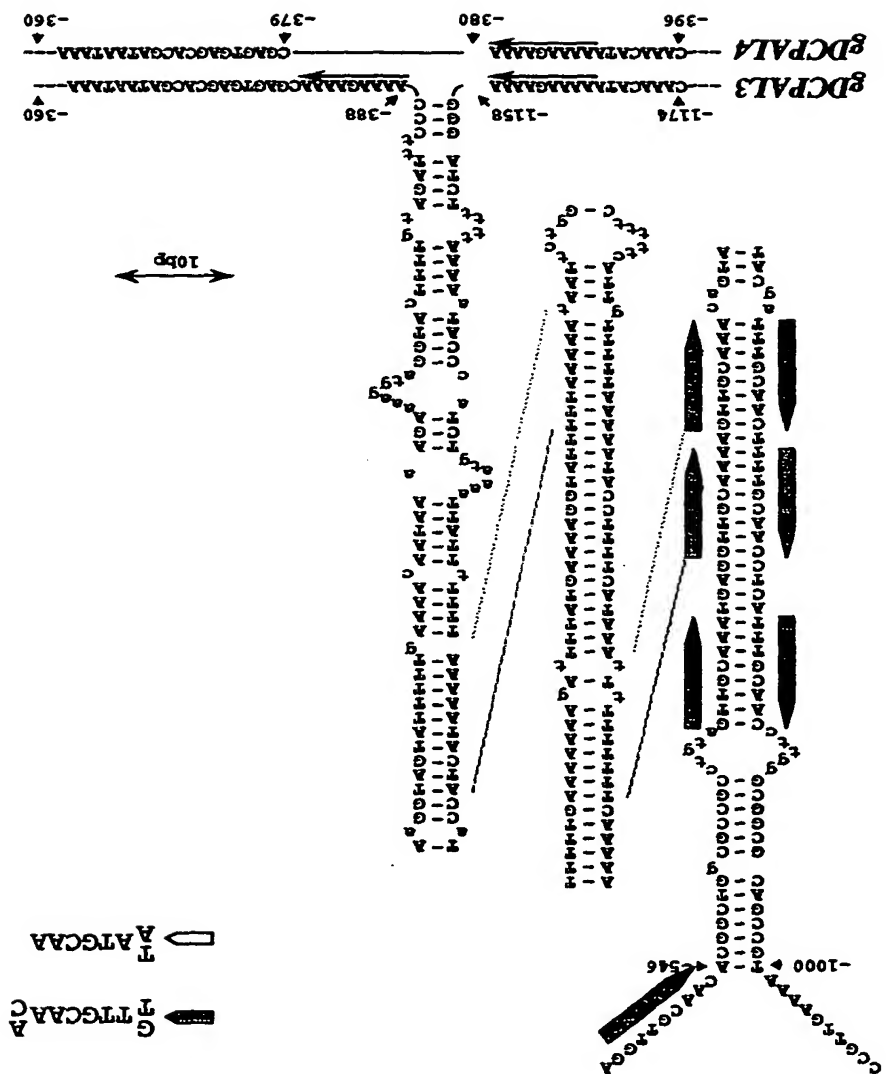


ニンジン PAL 遺伝子 *gDCPAL3* から見出された  
IS1 因子と既知の *Slowaway* 遺伝子との相同性の比較

Gene	Position	Slowaway	size(bp)
IS1 因子	(5'-1597)	TACTGCGGAGGCGGCATTTTTCCTTAAAGCGTCAATTTTCTTTT	303
carrot DCS	(5'-514)	TACTGCTTCTGATGCTGATTTTAAATGCTTAAACAATTCTTTT	253
carrot DCS	(5'-409)	TACTGCGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	249
petunia CHS	(1n1 884)	TACTGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	122
tomato PAL	(5'-454)	TACTGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	248
paralely PR2	(5'-415)	TACTGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	243
tobacco CHN	(5'-1209)	TACTGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	244
pea lectin	(5'-1296)	TACTGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	275
rape RPS	(1n5 1635)	TACTGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	220
potato patatin	(1n2 922)	TACTGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	259
rice PGM	(5'-432)	TACTGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	122
maize zein	(3' UTR)	TACTGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	163
wheat AKT	(5'-458)	TACTGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	100
barley RGA	(1n3 839)	TACTGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	159
sugarcane PRP	(1n6 2675)	TACTGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	267
sorghum PRP	(5'-469)	TACTGCTTGGCTTACCTTTTAACTTAACTTAACTTAACTT	255


 TATGCA  

 GTTGCAAC



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規M I T E様配列の提供。

【解決手段】 ニンジン<sup>®</sup>のフェニルアラニンモノアリアーゼをコードする遺伝

子から単離された、植物由来の2つのM I T E様因子、特に新しい挿入重複配列

が(A) n G (A) n (nは1以上の整数)である、新しいファミリーに属する

M I T E様配列を有する新規挿入因子を提供する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000175283]

1. 変更年月日

1992年10月30日

[変更理由]

名称変更

住 所

大阪府豊中市三和町1丁目1番11号

氏 名

三栄源エフ・エフ・アール株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[599101760]

1. 変更年月日

1999年 7月21日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都東久留米市大門町2-3-6-302

氏 名

小関 良宏